Estudo da Expressão Imuno-Histoquímica da Metaloproteinase – 9 (MMP-9) em Lesões Periapicais

Study of the Immunohistochemical Expression of Metalloproteinase – 9 (MMP-9) in Periapical Lesions

Rachel Pollyana Falcão Lorena¹, Leorik Pereira da Silva², Ana Paula Veras Sobral³

Abstract

Purpose: evaluate the immunohistochemical technique using the expression of metalloproteinase - 9 (MMP-9) in periapical granulomas and cysts root. **Methods:** We selected 60 cases of periapical lesions of which 31 were periapical granulomas and 29 radicular cysts in 14 years in the Laboratory of Surgical Pathology Professor, Rildege Accioly, Faculty of Dentistry of Pernambuco FOP / UPE. Demographic data were collected through biopsy referral sheets on file in the laboratory. The sample comprised 47 cases were subjected to immunohistochemical technique that was performed using the streptavidin-biotin method, using anti-MMP7. The statistical test used was Fisher's exact test ($p \leq 0.05$). **Results:** 55.3% of the lesions corresponded to periapical granuloma while 44.7% corresponded to cysts. The most prevalent age group was 31-40 years old (40.9%). There was a higher number of cases were white (68.2%) and females (59.6%). Regarding symptoms accounted for 72.1% of asymptomatic lesions and radiographic radiolucent (88.6%), and the jaw anatomic location most affected (59.1%). Regarding the immunohistochemical expression of MMP-9 in periapical lesions, 19 cysts (90.5%) and 25 granulomas (96.2%) were positive showing intensities. **Conclusion:** The periapical granuloma is inflammatory periapical lesion odontogenic more common in Caucasians aged 31-40 years. The MMP-9 seems to participate in the process of development and maintenance of periapical cysts and granulomas, participating in the initial process of osteolysis primarily degrade various components of the extracellular matrix.

Keywords: Matrix Metalloproteinases; Immunohistochemistry; Odontogenic Cysts; Periapical Periodontitis.

Resumo

Objetivo: avaliar através da técnica imuno-histoquímica a expressão da metaloproteinase-9 (MMP-9) em granulomas periapicais e cistos radiculares. **Metodologia:** Foram selecionados 47 casos de lesões periapicais dos quais 26 eram granulomas periapicais e 21 cistos radiculares no período de 14 anos no Laboratório de Patologia Cirúrgica Prof^o Rildege Accioly, da Faculdade de Odontologia de Pernambuco FOP/UPE. Os dados demográficos analisados foram: sexo, raça, idade, sintomatologia, aspecto radiográfico e localização anatômica. A amostra composta por 47 casos foi submetida à técnica imuno-histoquímica que foi realizada através do método estreptavidina-biotina, utilizando o anticorpo anti-MMP9. O teste estatístico utilizado foi o exato de Fisher ($p \leq 0,05$). **Resultado:** 55,3% das lesões encontradas corresponderam a granuloma periapical. A faixa etária prevalente foi de 31 a 40 anos de idade (40,9%). Observou-se maior número de casos da raça branca (68,2%) e do sexo feminino (59,6%). Quanto à sintomatologia 72,1% corresponderam a lesões assintomáticas, e quanto ao aspecto radiográfico radiolúcida em 88,6% dos casos, sendo a maxila a localização anatômica mais acometida (59,1%). Em relação à expressão imuno-histoquímica da MMP-9, 19 cistos (90,5%) e 25 granulomas (96,2%) foram positivos, exibindo intensidade de

¹ Aluna do Curso de Especialização em Endodontia da FOR/FOPCB (Faculdade de Odontologia do Recife/Fundação Odontológica Presidente Castello Branco - Recife-PE, Brasil).

² Aluno do Curso de Odontologia da FOP/UPE (Faculdade de Odontologia da Universidade de Pernambuco/Universidade de Pernambuco – Recife - PE, Brasil).

³ Professora Adjunta das Disciplinas de Patologia Geral e Bucal da FOP/UPE (Faculdade de Odontologia da Universidade de Pernambuco/Universidade de Pernambuco - Recife - PE, Brasil).

Correspondência: Ana Paula Veras Sobral

Endereço: Rua Monte Alverne, 107/05, Hipódromo – CEP 52 041-610 – Recife – PE – Brasil

Fone: (81) 91390136

E-mail: anapvsobral@yahoo.com.br

Data de Submissão: 16/10/2012

Data de Aceite: 08/01/2013

expressão variada. **Conclusão:** O granuloma periapical é a lesão periapical inflamatória de origem odontogênica mais comum em indivíduos da raça branca na faixa etária entre 31 – 40 anos. A MMP-9 parece participar do processo de desenvolvimento e manutenção dos cistos e granulomas periapicais, participando do processo inicial de osteólise principalmente por degradar vários componentes da matriz extracelular.

Palavras-Chave: Metaloproteinases da matriz; imuno-histoquímica; cistos odontogênicos; periodontite periapical.

Introdução

A infecção bacteriana na polpa dentária induz uma resposta inflamatória, que, não sendo tratada, determina a sua destruição e consequente contaminação do sistema de canais radiculares e túbulos dentinários, desencadeando, por sua vez, infecção no periodonto apical. A persistência desse evento provoca a migração, ativação e a interação coordenada de células imuno-competentes caracterizando a periodontite apical. Essa reação de defesa do periodonto apical frente à persistência dos agentes irritantes contidos no sistema de canais radiculares infectados leva a instalação de um processo crônico e com o decorrer do tempo, a reabsorção dos tecidos periapicais (HONG et al., 2004; CARNEIRO, 2006; MACHADO, 2007; SAYÃO et al., 2007 SANTOS et al., 2011).

Para elucidar melhor o mecanismo pelo qual a inflamação crônica pulpar decorrente de uma infecção bacteriana venha comprometer e destruir os tecidos periapicais é necessário que se estude as interações celulares com a matriz extracelular (MEC), em Odontologia, atualmente os estudos acerca da MEC e processos inflamatórios têm sido bastante discutidos, principalmente em periodontia e endodontia, essas interações são essenciais para um normal desenvolvimento e funcionamento dos processos fisiológicos e fisiopatológicos do organismo humano. A modulação destas interações entre célula e matriz ocorre por meio da ação de um único sistema proteolítico, responsável pela hidrólise de uma variedade de componentes da MEC. A renovação e remodelação da MEC devem

ser altamente reguladas. A proteólise descontrolada contribui para um desenvolvimento anormal e geração de muitas condições patológicas (MASSOVA et al., 1998; HENRIQUES et al., 2011; LI et al., 2012; PAULA-SILVA et al., 2010).

Dentre os componentes da MEC, o colágeno é a principal proteína destruída durante o desenvolvimento das lesões periapicais, determinando a degradação dos feixes de fibras colágenas que ligam os dentes ao osso circundante. A degradação do colágeno se dá por um grande grupo de enzimas, conhecidas por metaloproteinases da matriz (MMPs), que secretadas por várias células, dentre elas as células inflamatórias, regulam o equilíbrio entre célula e matriz. As MMPs são endopeptidases zinco dependentes, conhecidas por suas habilidades de clivar um ou muitos constituintes da MEC, bem como proteínas não pertencentes à mesma. As MMPs estão associadas com remodelação tecidual e diversos processos patológicos, tais como: artrites, metástases tumorais, cicatrização, angiogênese, inflamação, desenvolvimento embrionário (KUBOTA et al., 2000; CARNEIRO, 2006; COROTTI et al., 2009).

Em culturas de células, da polpa humana e ligamento periodontal, submetidas a sobrenadantes de *Porphyromonas endodontalis* e *Porphyromonas gingivalis* detectou-se a produção de MMPs, a qual foi tempo e dose dependente, onde as principais collagenases secretadas foram as MMP-2 e MMP-9, indicando que a ativação de MMPs deve ser um dos caminhos degradativos do hospedeiro na patogênese da lesão periapical induzida por microrganismos (CHANG et al., 2002; NGUYEN; ARKELL; JACKSON, 2001; SUZUKI et al., 2001).

A MMP-9 ou gelatinase B é uma enzima funcional de vários domínios que atua nas fases aguda e crônica de doenças inflamatórias e neoplásicas, contendo como substratos: Laminina, fibronectina, elastina, colágeno IV, V, VII, X e colágeno tipo I desnaturado. A MMP-9 é essencial para a iniciação do processo de reabsorção osteoclástica, removendo a camada de colágeno a partir da superfície óssea antes da desmineralização ser iniciada (COROTTI et al., 2009; CARNEIRO, 2006).

Tendo em vista a importância do melhor conhecimento acerca dos processos inflamatórios crônicos do periápice, este trabalho tem como objetivo estudar a prevalência das lesões periapicais bem como estudar a interação entre a MEC e as células envolvidas em tais lesões através da imunoposição da MMP-9.

Materiais e Métodos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição através do registro CAAE nº 0082.0.097.000-10.

Foram selecionadas quarenta e sete (47) amostras de lesões periapicais emblocadas em parafina aptas à técnica Imuno-histoquímica, das quais 26 eram granulomas periapicais e 21 eram cistos radiculares, tais amostras eram provenientes do Laboratório de Patologia Bucal da FOP (UPE). Os dados pertinentes à descrição do universo pesquisado (sexo, idade, raça, sintomatologia, aspecto radiográfico e localização anatômica) foram coletados das fichas de entrada para biópsias.

Para as análises estatísticas, a variável raça foi dividida em: 1) branca; 2) negra. Sintomatologia em: 1) sintomática; 2) assintomática. Aspecto radiográfico: 1) radiolúcida; 2) radiopaca; 3) mista. Localização anatômica em: 1) maxila e 2) mandíbula.

A expressão das MMPs-9 foi verificada através da técnica imuno-histoquímica pelo método da estreptavidina-biotina peroxidase, otimizado com o sistema de amplificação LSAB (Labeled StresAvidin Biotin for mouse primary antibody – DAKO), utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-MMP9, numa diluição de 1:125 e incubação por 1h, sendo que o tratamento antigênico consistiu em imersão dos cortes

em panela de pressão elétrica com solução de citrato pH 6,0 por 1 minuto. A diaminobenzidina (3,3-diaminobenzidina; Sigma Chemical CO, USA) foi usado como cromógeno, após a revelação os cortes foram contra-corados por Hematoxilina de Harris durante 15 segundos, desidratados em imersões decrescentes de etanóis e diafanizados em Xilol.

A imunomarcção foi analisada à microscopia de luz, considerando-se os seguintes aspectos: o tipo de célula imunopositiva, a localização celular (membranar ou citoplasmática), a distribuição tecidual (focal ou difusa) e a intensidade da imunomarcção. O padrão de imunoposição da MMP-9 foi classificado quanto à presença (+) ou ausência (-), e quantitativamente para os casos positivos em: fraca (+), moderada (++) e intensa (+++), de acordo com a intensidade de marcação.

Foram utilizados o Software STATA/SE 9.0 e o Excel 2007 para realizar a análise estatística. Os resultados estão apresentados em forma de tabela e/ou gráficos com suas respectivas frequências absoluta e relativa. O Teste Exato de Fisher foi utilizado para verificar a associação entre as variáveis categóricas.

Resultados

Dos 47 casos pesquisados de lesões periapicais, em relação a faixa etária observou-se que 40,9% tinham de 30 a 40 anos de idade, 25% tinha menos de 30 anos, 18,2% tinham de 40 a 50 anos de idade e 15,9% tinha idade acima de 50 anos. Quando verificada a prevalência das lesões periapicais relacionadas à raça, observou-se que o maior número de casos foi detectado entre os indivíduos da raça branca 68,2%, seguindo da raça negra com 13,6%. Enquanto ao sexo, os resultados mostraram que o sexo feminino exibiu maior índice de ocorrência 59,6%, visto que o sexo masculino apresentou 40,4%.

De acordo com a ficha de encaminhamento para biópsia também foram colhidas informações quanto à sintomatologia das lesões periapicais, os resultados mostraram que o padrão assintomático exibiu maior índice de ocorrência 72,1%, enquanto que o padrão sintomático apresentou 27,9%. Em relação ao aspecto radiográfico as lesões tinham mais o padrão radiolúcida 88,6%, do que radiopaca 4,5%. Em relação à localização anatômica lesões periapicais foi mais comum na maxila 59,1% quando comparada a mandíbula 40,9%.

Em relação à expressão imuno-histoquímica da MMP-9 em lesões periapicais, 19 cistos (90,5%) e 25 granulomas (96,2%) foram positivos exibindo intensidades variadas, 3 casos não houve células coradas, sendo 2 cistos e 1 granuloma que não apresentaram positividade para MMP-9. Na Tabela 1 mostra-se o percentual de células coradas pela expressão imuno-histoquímica MMP-9 em granulomas e cistos radiculares.

Na figura 1 pode-se observar o controle negativo em cistos e granulomas periapicais. Tal controle foi obtido através da omissão do anticorpo primário (anti-MMP-9) procedendo-se a técnica imuno-histoquímica normalmente. Na Figura 1A observa-se um cisto periapical, verifica-se o epitélio cístico pavimentoso estratificado, cápsula cística e intenso infiltrado inflamatório livres de marcação imuno-histoquímica. Na Figura 1B observa-se um granuloma periapical, pode ser observado um infiltrado intenso constituído por linfócitos, neutrófilos e histiócitos também com ausência de imunomarcção.

Tabela 1. Avaliação das variáveis relativa às células coradas pela expressão imuno-histoquímica MMP-9

Variáveis	n	%
Expressão Imuno-histoquímica MMP-9		
Não há células coradas	3	6,4
Poucas células coradas	23	48,9
Algumas células coradas - Moderada (10 -25%)	17	36,2
Algumas células coradas - Intensa (25-50%)	4	8,5

Figura 1. Fotomicrografia mostrando um Cisto (A) e Granuloma periapical (B) com ausência de imunomarcção para MMP-9 (LSAB, x100 em A e B).

Na figura 2 pode-se observar imunomarcção pela MMP-9 em cistos periapicais. Na Figura 2A verifica-se o epitélio cístico pavimentoso estratificado exibindo imunomarcção citoplasmática intensa e difusa, na Figura 2B em maior aumento observa-se o epitélio cístico positivo, bem como exocitose e imunopositividade em células inflamatórias. Em 2C verifica-se discreta positividade numa área de tecido ósseo maduro. Um achado interessante na Figura 2D pode ser observado na cápsula cística imagens negativas de cristais de colesterol exibindo intensa imunomarcção difusa bem como pronunciado infiltrado inflamatório crônico também positivo para a proteína MMP-9.

Na figura 3 pode-se observar imunomarcção pela MMP-9 em Granuloma Periapical. Na Figura 3A observamos que a marcação foi citoplasmática moderada e difusa em tecido de granulação e fibroblastos. Em 3B pode ser observado um infiltrado intenso constituído por linfócitos, neutrófilos e histiócitos espumosos exibindo imunomarcção citoplasmática intensa e difusa. Na Figura 3C foi observado imunomarcção moderada a intensa tanto em células estromais quanto em células da periferia do tecido ósseo em uma área de remodelação. Na Figura 3D verifica-se marcação moderada em linfócitos e plasmócitos e ausência de marcação no Corpúsculo de Russel (*Ver seta*), tal ausência de marcação denota um controle negativo interno, visto que, o corpúsculo é formado por uma cristalização de imunoglobulina no citoplasma de um plasmócito.

Figura 2. Fotomicrografia mostrando a expressão IHQ da MMP-9 em Cisto Periapical (LSAB, x100 em A e D ; x400 em C e B).

Figura 3. Fotomicrografia mostrando a expressão IHQ da MMP-9 em Granuloma Periapical (LSAB, x100 em A e D ; x400 em C e B).

Discussão

Em relação à sintomatologia foi observado, em nosso estudo, que 72,1% das lesões periapicais são assintomáticas, o que está de acordo com Neville *et al.*, (2009) onde afirmam que caracteristicamente, o dente envolvido com a lesão periapical não apresenta mobilidade ou sensibilidade à percussão vertical, bem como não responde aos testes pulpares térmicos ou elétricos, a menos que a necrose pulpar esteja relacionada a um único canal em um dente multirradicular.

Quanto ao aspecto radiográfico nas lesões periapicais da amostra, pode-se observar um percentual elevado de lesões radiolúcidas (88,6%) quando comparado com lesões radiopacas (4,5%) sendo na maxila o sítio anatômico mais frequente,

correspondendo a 59,1% dos casos e a mandíbula a 40,9% dos casos o que está em acordo com a literatura. A descrição clássica da aparência radiográfica do cisto radicular é a radiolucidez de formato arredondada ou ovoide, circundada por margem radiopaca, que se estende a partir da lâmina dura do dente envolvido (NEVILLE et al., 2009; SHEAR; SPEITGHT, 2011).

Além das variáveis clínicas concernentes aos cistos e granulomas periapicais este trabalho se propôs a estudar a relação entre essas lesões e a MEC através da expressão da MMP-9. Em nossa amostra mais de 90% dos casos de cistos e granulomas periapicais foram imunopositivos para MMP-9, o que afirma que as MMPs são expressas em baixo nível nos tecidos normais, mas aumentadas durante processos inflamatórios (CARNEIRO, 2006; NAVARRO et al., 2006).

As células inflamatórias foram mais imunopositivas para MMP-9 em nossa pesquisa. Segundo Carneiro (2006) as proteinases são produzidas, também, por células inflamatórias, como as collagenases (MMP-1 e/ou MMP-8), elastase e gelatinase (MMP-2 e/ou MMP-9), as quais irão promover a desnaturação do colágeno ou gelatina da matriz extracelular. Na inflamação, as MMPs-9 são principalmente secretadas por leucócitos polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) e macrófagos.

Os resultados do estudo em questão demonstraram que a expressão imuno-histoquímica da MMP-9, no granuloma periapical as células mononucleares dispersas pelo tecido de granulação foram positivas. As imunomarcações se apresentaram heterogêneas, contudo tal fato pode ser justificado pelo resultado anatomopatológico, isto é, os granulomas periapicais demonstraram morfologia variada e diferente quantidade de componentes celulares. Tais variações aparecem por conta do estágio em que a lesão se apresenta (LEONARDI; CALTABIANO; LORETO, 2005).

Granulomas com intenso infiltrado inflamatório do tipo linfohistioplasmocitário podem estar em fase evolutiva diferente de um granuloma com característica predominantemente fibroblástica e colagênica, contendo de permeio essas células inflamatórias (CALLESTINI, 1996; MÁRTON; KISS, 2000). É importante salientar, ainda, que há diferença na distribuição dos macrófagos nas lesões periapicais. A maior concentração de células inflamatórias ocorre na região central dos granulomas periapicais, em decorrência do estímulo flogógeno mais intenso. Márton e Kiss, em 2000, reafirmam tal assertiva, enfatizando que a maior concentração de células mononucleares ocorre na região central dos granulomas periapicais devido à proximidade do forame apical. Observou-se, também, maior positividade em células de permeio ao tecido ósseo em granulomas que em cistos periapicais o que denota um maior processo de remodelação óssea que cede lugar aos componentes celulares nos granulomas.

Em relação à distribuição de macrófagos, Santos e Lima (2009), estudaram a presença de células CD68+ nos tecidos periapicais e constataram que a distribuição de macrófagos CD68+ representam uma resposta imune mediada pelo hospedeiro à inflamação, sendo esta mais intensa em granuloma periapical do que em cistos radiculares.

Nos cistos periapicais a expressão da MMP-9 se deu tanto em epitélio de revestimento cístico quanto em células da cápsula e infiltrado inflamatório, estes achados também foram vistos por Silveira et al. (2007). Observamos ainda que a imunoexpressão da MMP-9 em lesões de periápice, como cistos radiculares, reflete a existência de um processo patológico mediado por células inflamatórias que está sujeito a variações em sua intensidade, o qual pode interferir na expressão desta proteinase, esses resultados também corroboram os encontrados por Soares et al. (2007).

Como mencionado foi analisada a expressão da MMP-9 tanto nas células epiteliais como na cápsula dos cistos radiculares, sendo verificado que tais células são capazes de secretar essas

proteínas, as quais podem atuar na degradação da matriz óssea, contribuindo para o crescimento cístico. A afirmativa é baseada nas descrições de alguns autores, os quais reportaram ser a matriz óssea rica em fatores de crescimento e citocinas, onde as MMPs não somente solubilizam tal estrutura, como também regulam o início da reabsorção (SILVEIRA et al., 2007). Também tem base nas afirmativas de Okada, Y. et al. (1995) de que as MMPs -2 e -9 são essenciais na completa degradação do colágeno, atividade associada à clivagem inicial realizada pela MMP-1.

A MMP-9 por ser uma enzima proteolítica que degrada gelatinases, colágenos I, IV, V, VII, XI e XIV, nidogênio, laminina, elastina, fibrilina, osteonectina, fibronectina, entre outras, alguns componentes principais de membranas basais, permite que haja proteólise associada à migração de células endoteliais, o que promove angiogênese em sítios inflamatórios. Assim, MMP-9, foi identificada como uma das moléculas essenciais para a angiogênese, tanto em condições patológicas e fisiológicas. Apesar de escassos os estudos sobre a expressão de MMP-9 em lesões periapicais seus resultados sugerem que a MMP-9 pode desempenhar um papel na destruição da matriz extracelular associada à manutenção / progressão destas lesões (RUIZ et al., 2010).

É necessária a realização de mais estudos com maiores casuísticas e envolvendo outras MMPs da matriz para melhor explicar o comportamento e desenvolvimento dessas lesões periapicais.

Conclusão

A análise e discussão dos resultados obtidos no presente trabalho permitiram-nos concluir que não houve correlação estatisticamente significativa entre a expressão da MMP-9 e as variáveis clínicas, no entanto a expressão nas lesões periapicais inflamatórias estudadas indicam que a MMP-9 parece participar do processo de desenvolvimento e manutenção dos cistos e granulomas periapicais, participando do processo inicial de osteólise principalmente por degradar vários componentes da matriz extracelular.

Referências

- CALLESTINI, R. **Localização e distribuição de macrófagos identificados imunohistoquimicamente em cistos periodontais apicais de dentes tratados ou não endodonticamente. Contribuição para a compreensão da regressão não cirúrgica dos cistos periodontais apicais.** 1996. 97 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru.
- CARNEIRO, E. **Análise da expressão de MMP -2,-9, -14, TIMP -1,-2 e RECK em granulomas e cistos periapicais.** 2006. 99 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru.
- CHANG, Y.C. et al. Stimulation of matrix metalloproteinases by black-pigmented *bacteroides* in human pulp and periodontal ligament cell cultures. **J. Endod.**, Chicago, v. 28, no. 2, p. 90-93, Feb. 2002.
- COROTTI, M.V. et al. Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 54, no. 8, p. 764-71, Aug. 2009.
- HENRIQUES, A.C et al. Comparative analysis of the immunohistochemical expression of collagen IV, MMP-9, and TIMP-2 in odontogenic cysts and tumors. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**

Endod. Oral Radiol. Endod., St. Louis, v.112, no. 4, p. 468-75, Oct. 2011.

HONG, C.Y. et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 33, no. 3, p.162-169, Mar. 2004.

KUBOTA, Y. et al. Interleukin-1 alfa dependent regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) secretion and activation in the epithelial cells of odontogenic jaw cysts. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 79, no. 6, p. 1423-1430, June 2000.

LEONARD, R.; CALTABIANO, R.; LORETO, C. Collagenase -3 (MMP-13) is expressed in periapical lesions: na imunohistochemical study. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 38, no. 5, p. 297-301, May 2005.

LI, G. et al. Associação de metaloproteínas de matriz (MMP) -1, 3, 9, a interleucina (IL) -2, 8 e (COX) ciclooxigenase -2 polimorfismos do gene com periodontite crônica em uma população chinesa. **J. Cyto.**, [S.I.], v. 60, no. 2, p. 552-560, Nov. 2012.

MACHADO, M.E.L. **Endodontia: da biologia à técnica**. São Paulo: Liv. Santos, 2007. Cap.2, p. 17-38.

MÁRTON, I.J.; KISS, C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 15, no. 3, p. 139-150, June 2000.

MASSOVA, I. et al. Matrix metalloproteinase: structures, evolution and diversification. **FASEB J.**, Bathesda, Md., v. 12, no. 12, p. 1075-95, Sept. 1998.

NAVARRO, V.P. et al. A participação das metaloproteínas da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. **Rev. Odontol. UNESP**, Marília, v. 35, n. 4, p. 233-38, out./dez. 2006.

NEVILLE, B.W. et al. Doenças da polpa e do periápice. In: _____. **Patologia oral e maxilofacial**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. Cap. 3, p.119-152.

NGUYEN, M.; ARKELL, J.; JACKSON, C.J. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, Amsterdam, v. 33, no. 10, p. 960-970, Oct. 2001.

OKADA, Y. et al. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. **Lab. Invest.**, Baltimore, v. 72, no. 3, p. 311-322, Mar. 1995.

PAULA-SILVA, F.W. da et al. Matrix metalloproteinase expression on teeth with apical periodontitis is differentially modulated by the modality of root canal treatment. **J. Endod.**, Chicago, v. 36, no. 2, p. 231-237, Feb. 2010.

RUIZ, P.A. et al. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 in radicular and residual radicular cysts. **J. Appl. Oral Sci.**, Bauru, v. 18, no.6, Dec. 2010.